Chemische Beiträge zur Kenntnis der Substanz der hämoglobinämischen Innenkörper (sog. Heinzkörper).

SEP 18

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt

von

Hugo Kunkel
aus Darmstadt.

HEIDELBERG
Heidelberger Verlagsanstalt und Druckerei Theodor Berkenbusch.
1913.

Gedruckt
mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg.

Dekan:
Prof. Dr. Wilms

Referent:
Prof. Dr. Ernst

1913.

Meinen lieben Eltern.

Aus der II. mediz. Klinik der Universität Berlin (Geh. Rat Prof. Dr. F. Kraus).

Chemische Beiträge zur Kenntnis der Substanz der hämoglobinämischen Innenkörper (sog. Heinzkörper).

Von

Hugo Kunkel.

(Bei der Redaktion eingegangen am 25. Oktober 1912.)

Historische Einleitung.

Als erster hat Heinz bei Phenylhydrazinvergiftung des Blutes (Anämie) bei Säugetieren in den Erythrozyten gewisse singuläre rundliche, mit basischen Farbstoffen (Methylviolett) färbbare Körperchen genauer beschrieben, nachdem schon zuvor Ries[1]) bei Kalichloricumvergiftung ähnliche Gebilde gesehen und flüchtig erwähnt hat.

Später stellte es sich heraus (Huber, Schwalbe u. a.), daß dieselben Gebilde auch bei Vergiftungen mit anderen Giften ähnlicher Natur in prinzipiell gleicher Weise auftreten (Hydroxylamin, Nitrobenzol, Toluylendiamin), denen allen gemeinsam ist, daß sie imstande sind, in vitro das Hb in Methämoglobin und weiter wohl auch in Hämatin überzuführen, in vivo aber beim Tier schwere hämotoxische (perniziosaähnliche) Anämie erythrorrhektisch hyperchromen Charakters zu erzeugen. Nur bei solchen Vergiftungen entsteht Heinzkörperbildung, nie bei anderen; umgekehrt freilich ist das Pyrogallol, dem auch eine methämoglobinogene Fähigkeit gemeinhin zugelegt wird, dazu nicht imstande.

Dora Friedstein erbrachte bei Pappenheim den schlüssigen

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1882, S. 786.

stringenten Beweis (wobei sie mit Mischungen zweier Gifte, des Pyrodins und Toluylendiamins arbeitete), daß diese supravital basophil färbbaren Körperchen identisch sind mit den sogenannten hämoglobinämischen Innenkörperchen Ehrlichs (methämoglobinämische Degeneration), die bekanntlich im fixierten Trockenpräparat des Blutes äußerst stark hyperoxyphil erscheinen. Sie zeigte ferner, daß zu ihrer Vitalfärbung das Nilblau besonders geeignet ist, sowie auch gewisse saure Farbstoffe, besonders Eosine.

Nachdem Krönig noch besonders bewiesen hatte, daß diese mit Blutfarbstoff oder einem Abkömmling desselben beladenen Körperchen jedenfalls kein Methämoglobin enthalten, fand Suzuki (ebenfalls bei Pappenheim), indem er zwei verschiedene Toluylendiamine, das Toluylendiamin 1, 2, 4 und das Toluylendiamin 1, 3, 4 verwandte und mit Pyrodin kombinierte, daß diese Körperchen im Blut nur bei der Vergiftung des Versuchstiers in vivo, nicht bei Zusatz des Blutes zum Gifte in vitro sich bilden, in welch letzterem Fall sich nur eine Art Oberflächengerbung der Erythrozyten unter dem Einfluß und Kontakt des Giftes bildet.

Die vital entstandenen Heinzkörperchen sind es, welche das Substrat der sogenannten Pachydermie der phenylhydrazinanämischen Erythrozyten von Morawitz und Pratt bilden. Auf ihr beruht die äußerst hohe Resistenz der vergifteten Erythrozyten gegenüber der Saponinhämolyse in vitro, wie Morawitz fand, Sattler und zum Teil Rosenthal bestätigten; sie selbst aber beruht, wie Suzuki fand, auf den Heinzkörperchen. Gegenüber diesen in vivo vergifteten Erythrozyten ist nach Suzuki die Resistenz der in vitro entstehenden Gerbungspachydermie gegenüber Saponin eine viel geringere.

Wenn man bedenkt, daß in vitro viel stärkere Konzentrationen des Giftes mit einer viel kleineren Menge des Blutes in Berührung kommen und dieses daher viel stärker alterieren können, daß dagegen in vivo nur kleinste untertödliche Dosen in großer Verdünnung auf eine viel größere Blutkörperchenmasse einzuwirken haben, daß trotzdem aber in allen Erythrozyten des gesamten Körperblutes die Heinzkörperbildung erzeugt wird, und zwar nicht sofort nach Einverleibung des Giftes, sondern erst nach einiger Zeit, so scheint Suzukis Schluß vollauf berechtigt, daß es nicht das genuine Gift ist, dem die Heinzkörperbildung zuzuschreiben ist, sondern vermutlich gewisse Reduktions- und Abbauprodukte desselben, die sich erst im Körper bilden. (Ein ähnlicher Schluß ergibt sich für die Vitalfärbung nach Goldmann und Schulemann sowie für die Saponinvergiftung. Das Saponin wirkt nämlich

nur in vitro, nicht in vivo erythrolytisch, in vivo vielmehr myelotoxisch!)[1])

Wenn man weiter in Betracht zieht, wie allmählich das Gift zu der Erzeugung der spezifischen Heinzkörperdegeneration gelangt (daneben erzeugt das Gift auch noch allgemeine Hb-Auslaugung, Anisozytose, Erythrorrhexis mit Ausstoßung der Heinzkörperchen in Schizozytenform), ferner daß die spezifische Heinzkörperbildung bei geeigneter Dosierung des Giftes unterdrückt werden kann, wobei dann lediglich eine diffuse Hyperchromie der degenerativen Anisozyten resultiert, daß fernerhin mit der Dauer der Vergiftung und der protrahierten Giftdarreichung die Größe der Heinzkörperchen fort und fort zunimmt, so drängt sich der Gedanke auf, daß die Heinzkörper doch wohl nicht ein wohl umschriebener präformierter morphologischer Bestandteil der Erythrozyten sind,

---

[1]) Auch bei der Toluilendiaminvergiftung haben Joanovicz und Pick*) gezeigt, daß dieses Gift in vitro nicht hämolysierend wirkt, sondern erst nach seiner Einverleibung im Körper. Sie nehmen aber an, daß sich unter dem Einfluß dieses Giftes in Milz und Leber hämolytisch wirksame Lipoide bilden oder frei werden sollen, die dann ihrerseits zerstörend auf die Erythrozyten einwirken möchten. Im Prinzip der gleichen Ansicht sind Gilbert und Chabrol.

Handrock**) rechnet auch das Benzidin derselben Giftkategorie zu, das nur indirekt durch Vermittlung der Milz hämolytisch wirken solle.

Demgegenüber konnten Widal, Abrami und Brulé***) in der Milz der vergifteten Tiere keinerlei Hämolysin auffinden, ebensowenig wie im Blutplasma und in den Erythrozyten.

Gilbert und Chabrol meinten daraufhin, daß das Gift nicht sowohl die Milz zu vermehrter Produktion von Hämolysinen stimuliert, als vielmehr die Resistenz der Erythrozyten gegenüber den normalen Hämolysinen der Milz herabsetzt. Milzextrakt des vergifteten Tieres soll nur auf mit Gift in vitro beladene und sensibilisierte Erythrozyten hämolysierend wirken.

Demgegenüber konnten Widal und seine Mitarbeiter wieder zeigen, daß höchstens die unfrischen Produkte der autolysierten Milz hämolytische Eigenschaften enthalten, daß dagegen andererseits Milzexstirpationen am Resultat der Vergiftung nichts ändere, weder das Auftreten von Anämie noch von Ikterus verhindert, wohingegen das Serum der anämisierten Tiere auch bei Vorhandensein der Milz frei von allen irgendwelchen Hämolysinen ist.

Hiernach dürfte aus alledem wohl folgen, daß das Toluylendiamin und nach Analogie auch das prinzipiell wohl ähnlich wirkende Pyrodin in vivo wirksam ist zwar nicht durch direkten Einfluß und Kontakt auf die Erythrozyten, aber auch nicht indirekt durch Vermittlung der Milz (Joannovicz, Chabrol), wohl aber durch chemische Abbauprodukte seiner selbst (Pappenheim-Suzuki).

---

*) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therapie, Bd. VII.
**) Deutsch. Arch. f. klin. Medizin, Bd. CVII.
***) Cpt. rend. Soc. Biol., t. LXXII, p. 732.

wie V. Schilling[1]) und neuerdings auch O. Huber[2]) annehmen, der mit dem zunehmenden Einfluß der Vergiftung bloß zur isolierten Sichtbarmachung gelangt, sondern es scheint wahrscheinlicher, daß sich diese Gebilde erst unter dem degenerativen Einfluß der Vergiftung neu bilden. Schilling hält sie für gewisse restierende Bestandteile des ehemaligen Kerns, Huber für ursprüngliche basophile Bestandteile der Jugendunreife.

Uns scheint richtiger, mit Friedstein anzunehmen, daß es sich um chemisch alteriertes Hämoglobin handelt, das sich mit dem Stromalipoid amalgamiert und legiert, und so, im Plasma frei als Schizozytensplitter flottierend, in resistenter Form der Hämolyse entgeht und dadurch ebenfalls — da die Schizozyten bei der Hämozytometrie nicht mitgezählt werden, aber bei der Hämoglobinometrie mitfärben — zur Erhöhung des Hämoglobinindex solcher Anämien beiträgt.

Zuletzt gelang nun W. Hartwig, ebenfalls bei Pappenheim, ihre Reindarstellung in Massen. Er stellte mit ihrer Substanz verschiedene chemische Reaktionen an, fand sie in Pepsin-Salzsäure und verdünnter Essigsäure löslich. Er spricht ihnen einen gewissen Eiweißcharakter (Nukleoalbumin oder Histon) zu.

Wir wollen im folgenden seine Ergebnisse zu ergänzen suchen, indem wir diesmal mit ihrer Substanz in Lösung, also mit der gelösten Substanz der Heinzkörperchen, weitere chemische Reaktionen anstellen und auch die etwaigen lipoiden Extraktionsprodukte etwas genauer untersuchen wollen.

Eigene Versuche.

Bevor wir über die rein chemischen Arbeiten berichten, mögen einige Abschnitte aus den Versuchsprotokollen Aufschluß geben, in welcher Weise wir bei der Vergiftung der Tiere verfuhren. Als Versuchstiere dienten Kaninchen. Für die Injektionen bereiteten wir folgende Lösungen vor:

Lösung I.	Toluylendiamin-(1, 3, 4)	0,5 g,
	Pyrodin	0,5 g,
	gelöst in 10 ccm Aqua	destill.
Lösung II.	Toluylendiamin-(1, 2, 4)	3,0 g,
	Pyrodin	1,0 g,
	gelöst auf 20 ccm Aqua	destill.

[1]) Schilling, Fol. Haem., Bd. XIV.
[2]) Huber, Deutsche med. Wochenschr. 1912, Nr. 42.

13. Juli 1912. Von Lösung I mischten wir 1 ccm mit 1 ccm der Lösung II und injizierten subkutan.

14. Juli 1912. 24 Stunden nach der Injektion zeigte uns ein aus der Ohrvene entnommener Blutabstrich mit Nilblau[1]) supravital gefärbt, daß in einer großen Anzahl von roten Blutzellen sich Heinzkörperchen vorfanden, die sich blaß blau-grün färbten und teils im Zentrum, teils an die Zellperipherie derart angelagert waren, daß diese sich vorwölbte. Das Plasma wies keine sonstige Veränderung auf. Ich möchte an dieser Stelle gleichzeitig bemerken, daß ich bei einem anderen Kaninchen schon 15 Stunden nach der ersten Subkutaninjektion und derselben Dosierung Heinzkörperchen in den roten Blutzellen, zwar sehr klein, aber mit Nilblau-Vitalfärbung intensiv dunkelblau-grün, auch schon vereinzelt extrazellulär im Plasma gesehen habe.

15. Juli 1912. Es zeigte sich, da wir die Injektion nicht erneuert hatten, nichts mehr von den charakteristischen Erscheinungen des vorigen Tages. Es wurden nun in derselben Weise 2 ccm unserer Lösungen subkutan injiziert. Nach 5 Stunden waren die Heinzkörper in blaßgrüner Färbung mit Nilblau und zwar in Abschnürung von den Blutkörperchen begriffen zu sehen; Zellplasma somit unverändert.

16. Juli 1912. Ohne weitere Injektion ergab ein am Morgen angefertigtes, mit Nilblau supravital gefärbtes Präparat, daß sowohl in den roten Blutzellen, als auch extrazellulär im Plasma frei schwimmend zahlreiche kleine Heinzkörperchen in blaßgrüner Färbung vorhanden waren. Eine Stunde später erfolgte eine erneute Injektion subkutan und zwar so, daß wir Lösung I und II getrennt einspritzten.

17. Juli 1912. Nach 24 Stunden bemerkten wir an einem mit Nilblau supravital gefärbten Blutpräparat, daß die Heinzkörperchen bedeutend größer, intensiv dunkelblau-grün gefärbt an den roten Blutkörperchen hängen und auch frei im Plasma schwammen. Wir injizierten nun intraperitoneal 1 ccm einer Mischung zu gleichen Teilen von Lösung I und II.

18. Juli 1912. Das Kaninchen lebte aber in den letzten Zügen. Der Körper fühlte sich warm an. Das Blut wurde nun sofort nach Eröffnung der großen Gefäße, der Vorhöfe und Ventrikel in sterile Gefäße aufgefangen. Wir erhielten nur 24 ccm Blut, das eine ins Braune übergehende Färbung aufwies. Ein bei dieser Gelegenheit mit Nilblau supravital gefärbtes Blutpräparat zeigte die Heinzkörper in großer Anzahl extrazellulär im Plasma, dunkelblau-grün gefärbt und von bedeutender

[1]) Es sei bei dieser Gelegenheit mitgeteilt, daß ein von Pappenheim zu diesem Zweck mir empfohlener Farbstoff, Naphtholblau, die Körperchen womöglich noch intensiver und avider (bräunlich-violett) färbte.

Größe. Nach der Methode von Hartwig[1]) zentrifugierten wir, nachdem als gerinnungshemmende Substanz $1^1/_2$ ccm der Pappenheimschen Lösung von isotoxischem (8 %) Rohrzucker versetzt mit Natrium citricum, Natriumoxalat und Natriumfluorid āā 0,5 dem Blute zugesetzt worden war, $^1/_4$ Stunde. Das klare Serum ist ziemlich stark braunrot gefärbt. Der Bodensatz enthält die Blutkörperchen und eine schmutzig lehmfarbene Substanz. Mehrere Male wird mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und zentrifugiert, dann die Blutkörperchen, vom Serum befreit, durch Zusatz von Aqua destillata und etwas Äther lackfarben gemacht. Es bleibt nun nach dem Zentrifugieren als Bodensatz nur die lehmfarbene Substanz übrig, die noch verschiedene Male mit Aqua destillata unter Zusatz von etwas Äther ausgewaschen und zentrifugiert wird. Dieser Rückstand, der nach der Beschreibung von Hartwig ausschließlich aus Heinzkörperchen bestehen soll, wurde nun mikroskopisch geprüft. Bei Nilblau-Vitalfärbung sieht man in der Tat fast nur Heinzkörper in intensiv blaugrüner Färbung und einzelne Leukozyten. Im Eosin-Vital-Präparat färbten sie sich rot. Die kombinierte Nilblau-Eosin-Vitalfärbung läßt sie, wie bei früheren Versuchen, ungefärbt, da, wie Pappenheim fand, zwei Farbstoffe bei der Supravitalfärbung sich gegenseitig behindern.

Mit der nach Hartwigs Methode gewonnenen reinen Substanz der Heinzkörper haben wir nun verschiedene Reaktionen angestellt.

Es wurde versucht, noch andere Lösungsmittel ausfindig zu machen und zu bestimmen, in welcher Konzentration sie am besten die Substanz lösten.

Ferner haben wir, was Hartwig noch nicht gemacht hatte, mit den konzentrierten Lösungen der Substanz verschiedene Reaktionen auf Blutfarbstoff und Eisengehalt angestellt;

und schließlich versucht, über die Natur des Eiweißkörpers, der etwa vorhandenen Fettkörper und Lipoide und anderer Bestandteile Klarheit zu schaffen.

I. Lösungsversuche an der Substanz.

Hartwig fand, daß sich die Substanz der Heinzkörper in verdünnter Essigsäure (S. 263) sowohl, wie in Pepsin-Salzsäure (S. 265) klar löste. Wir stellten nun noch weitere Löslichkeitsversuche an. Es ist nötig, daß bei diesen Untersuchungen nur feine Aufschwemmungen der Substanz verwendet werden, bei denen jede Bildung von Konglomeraten, die beim Zentrifugieren sehr leicht entstehen, zu vermeiden sind. Bei Verwendung von sehr verdünnten Säuren, z. B. Essigsäure, schwächer

[1]) Fol. Haem. 1912, Bd. XIII, Archiv.

wie 10proz., oder Salzsäure 1proz. beobachteten wir, daß die Heinzkörper aufquollen und eine opaleszente Lösung bildeten, die sich erst beim Erwärmen aufklärte. In ähnlicher Weise verhielten sie sich zu Alkalien. Hier trat diese Eigenschaft noch mehr hervor. In der Kälte gelang es überhaupt nicht, auch bei Anwendung stärkerer Konzentrationen wie $^1/_{10}$-Normalnatronlauge, die wir gewöhnlich benutzten, eine vollständig klare Lösung zu erzielen. Immer zeigte sich diese opaleszente Trübung. Aber bei nur leichtem Erwärmen im Wasserbad trat sofort klare Lösung ein.

Ebenso verhielt sich $^1/_{10}$-Normalsodalösung. Ammoniak löste die Substanz weder in der Kälte noch beim Erhitzen, auch nicht in Gegenwart von Ammoniumchlorid. Verdünnte 1proz. Kochsalzlösung löst nicht, auch nicht nach längerem Kochen. Aufschwemmungen von Kalziumkarbonat in Wasser, vermischt mit einer feinen Aufschwemmung der Substanz in Wasser, lösen sich nicht unter Entwicklung von Kohlensäure, auch nicht beim Erhitzen. Auf Kohlensäure wurde hierbei durch Überhalten eines mit Barytwasser befeuchteten Glasstabes geprüft.

Für unsere weiteren chemischen Reaktionen an der Substanz der Heinzkörper verwandten wir als die am besten geeigneten Lösungsmittel vornehmlich 10proz. Essigsäure und $^1/_{10}$-Normalnatronlauge.

II. Eisen und Blutfarbstoffreaktionen.

Diese Untersuchungen wurden teils als chemische an der 10proz. Essigsäurelösung der Heinzkörper und an der Trockensubstanz selbst, teils als mikroskopische und spektroskopische ausgeführt.

A. Eisenreaktionen.

1. Setzt man zur 10proz. Essigsäureauflösung der Substanz Ferrozyankalium und Salzsäure, so tritt nur eine schmutzige grau-braune Ausfällung auf, aber keine Blaufärbung. Auch auf Zusatz von Rhodanammonium in die 10proz. Essigsäureauflösung der Substanz erhielten wir keine positive Eisenreaktion.

2. Schwefelammonium, zur $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper zugesetzt, bewirkte keine schwarze Ausfällung von Schwefeleisen.

3. Die durch Äther, Alkohol, Benzol, Methylalkohol, Benzin, Essigäther und Chloroform entfettete und mit Natriumbisulfat unter Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure erhitzte und mit konzentrierter Salpetersäure behandelte, von ihren organischen Bestandteilen befreite Substanz ergab mit Ferrozyankalium und Salzsäure eine deutliche Berlinerblaureaktion.

B. Blutfarbstoffreaktionen.

a) Chemische Reaktionen.

1. Setzt man zur 10proz. Essigsäureauflösung der Heinzkörper Wasserstoffsuperoxyd, so zeigt sich keine Katalasewirkung.

2. Mit α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin erhielten wir in der 10proz. Essigsäureauflösung der Heinzkörper keine Indophenolreaktion.

3. Benzidinlösung erzeugt allein in der 10proz. Essigsäureauflösung der Heinzkörper keine Blaufärbung (Oxydasereaktion).

4. Reaktionen mit Benzidin und Wasserstoffsuperoxyd (Peroxydasereaktion).

α) Setzt man zur 10proz. Essigsäureauflösung der Heinzkörper 0,04proz. wässrige Benzidinlösung und Wasserstoffsuperoxyd, so erhält man eine deutliche, wenn auch schwache positive Peroxydasereaktion, die sich durch eine leicht grünliche Verfärbung der Lösung kennzeichnet. Beim Stehenlassen dunkelt sie in Olivenfarbe nach. Mit konzentrierter alkoholischer Benzidinlösung erhält man sehr starke Bildung von Benzidinblau auch nach Aufkochen der Essigsäurelösung, d. h. nach Zerstörung aller etwaigen organischen Fermente.[1])

β) In der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper tritt ebenfalls eine Reaktion auf. Es entsteht eine hellbraune Färbung, vielleicht beruhend auf Reduktion des gebildeten Benzidinblau.

5. Zusatz von Hydroxylamin zur 10proz. Essigsäureauflösung bewirkte eine leichte Trübung, aber keine irgendwie beschaffene Verfärbung. Setzt man dagegen Hydroxylamin zu dem lackfarbenen Blutwasser, von dem man die Heinzkörperchen abgeschieden hat, so bildet sich eine bräunliche Trübung. Setzt man Hydroxylamin zu dem ungelösten Heinzkörperchensediment, so ist an demselben keine irgendwie auffällige Veränderung wahrnehmbar, auch nicht in bezug auf die Vitalfärbbarkeit mit Nilblau.

6. Ferrizyankalium zur klaren, gelb gefärbten 10proz. Essigsäureauflösung der Heinzkörperchen gegeben, bewirkte keinerlei braune Verfärbung bei tropfenweisem Zusatz, sondern zuletzt einen grünlich-gelben Niederschlag.

7. Die durch Äther, Alkohol, Benzol, Methylalkohol, Benzin, Essigäther und Chloroform entfettete Eiweißsubstanz gab mit Benzidin, 0,04proz., und Wasserstoffsuperoxyd deutliche Peroxydasereaktion.

---

[1]) Zusatz bei der Korrektur: Auch mit alkoholischer Aloin- und Guajakharzlösung + H_2O_2 wird unter gleichen Umständen (nach Aufkochen) deutliche positive Reaktion erhalten.

b) Mikroskopische Untersuchung.

1. Wie schon in Hartwigs Arbeit unter 7, Seite 261, beschrieben, fanden auch wir, daß die Heinzkörper bei Zusatz von 0,04proz. Benzidin und Wasserstoffsuperoxyd auf dem Objektträger unter dem Mikroskop eine grünlich-blaue Färbung annehmen, während die umstehende Flüssigkeit ungefärbt erscheint.

2. Zu einer stark konzentrierten dunkelblaugrünen fluoreszierenden Auflösung der Heinzkörper in verdünnter Essigsäure setzten wir je einen Tropfen Eisessig und physikalische Kochsalzlösung auf dem Objektträger zu und fanden nach Erhitzung bei der mikroskopischen Untersuchung gelblich wachsartige Schollen und kleinste braunrote Klumpen und Splitter, aber keine typischen Teichmannschen Häminkristalle.

c) Spektroskopische Untersuchung.

1. Eine stark konzentrierte Auflösung von Heinzkörperchen in 10proz. Essigsäure, die eine dunkelbraungrüne Färbung und leichte Fluoreszenz aufwies, zeigte eine Verdunkelung nach Blauviolett im Absorptionsspektrum.

2. Eine stark konzentrierte, braungefärbte Lösung der Substanz in $^1/_{10}$-Normalnatronlauge ergab einen sehr schwachen, kaum merklichen Schatten in Gelb nach Orange zu.

III. Eiweißreaktionen.

Zu den Eiweißfällungsreaktionen verwandten wir in den meisten Fällen sowohl Lösungen von 10prozentiger Essigsäure, als auch alkalische Lösungen von $^1/_{10}$ Normalnatronlauge. Bei den Eiweißfarbenreaktionen wurde die für die Reaktion vorgeschriebene, entweder 10prozentige Essigsäure, oder alkalische $^1/_{10}$-Normalnatronlaugelösung in Anwendung gebracht.

A. Eiweißfällungsreaktionen.

1. Fällung mit Alkohol absolutus.

α) In der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper erzeugte absoluter Alkohol keine Fällung, auch nicht beim Erhitzen.

β) In der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung erhielten wir mit absolutem Alkohol keine Fällung, auch nicht beim Erhitzen.

2. Fällung mit Methylalkohol.

α) In der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper erzeugte Methylalkohol keine Fällung, auch nicht beim Erhitzen.

β) In der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung wurde durch Methylalkohol keine Fällung, auch nicht beim Erhitzen bewirkt.

3. Azeton fällte in der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper keinen Niederschlag aus.

4. Formol läßt die 10prozentige Essigsäureauflösung der Heinzkörper vollständig klar.

5. 10prozentiges Pyrrogallol gibt in der 10prozentigen Essigsäureauflösung keine Reaktion.

6. Phosphormolybdänsäure fällte, tropfenweise zur 10prozentigen Essigsäureauflösung der Substanz zugesetzt, einen voluminösen graubraunen Niederschlag aus.

7. Kochen der Lösungen.

α) Kochte man die 10prozentige Essigsäureauflösung der Heinzkörper auf, so schied sich kein koaguliertes Eiweiß ab.

β) Auch beim Kochen der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper erhielten wir keine Fällung.

8. Aussalzen mit Ammoniumsulfat.

α) Beim Versetzen der 10prozentigen Essigsäureauflösung mit konzentriertem Ammoniumsulfat fällt ein gelbweißer, stark voluminöser Niederschlag aus.

β) Beim Aussalzen der Eiweißkörper aus der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper mit konzentriertem Ammoniumsulfat erhält man einen stark voluminösen braunen Niederschlag.

9. Fällung durch verdünnte Kochsalzlösung.

α) Verdünnte Kochsalzlösung (0,2—1prozentig) erzeugt in der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper keine Trübung.

β) Auch in der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung wurde durch verdünnte 0,2- bis 1prozentige Kochsalzlösung keine Trübung hervorgerufen.

10. Fällung mit Osmiumsäure.

α) In der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper bewirkt 2prozentige Osmiumsäure keine Fällung.

β) In der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung tritt bei Zusatz von 2prozentiger Osmiumsäure eine Gelbfärbung auf.

10a. Neutralisiert man eine 10prozentige Essigsäureauflösung der Substanz tropfenweise durch Ammoniak oder Kalilauge 10prozentig (hier sehr vorsichtig), so tritt zunehmende Trübung ein, und um den Neutralisationspunkt herum fällt ein voluminöser, graubrauner Niederschlag aus (im Gegensatz zu Hartwig, S. 263, Abs. 24b).

10b. Versetzt man 10prozentige Essigsäureauflösung der Heinzkörper mit $^1/_{10}$-Normalnatronlauge, so entsteht keine Fällung. Der Grund hierfür ist wohl darin zu suchen, daß die Lösung durch Anwendung so schwacher Alkalien bei der Neutralisation allzu stark verdünnt wird.

10c. Zur stark konzentrierten $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper vorsichtig, nur tropfenweise, konzentrierte Essigsäure zugesetzt, entstand ein voluminöser Niederschlag, der sich in Überschuß des Reagens wieder löste.

10d. Zur $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper 10prozentige Essigsäure zugesetzt, wurde keine Fällung bewirkt.

11. Salpetersäure fällt aus der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Substanz einen hellgelben Niederschlag aus, der sich beim Erwärmen leicht und vollständig auflöst und beim Abkühlen wieder ausfällt. (Reaktion auf Albumose resp. Histon).

12. Fällung durch 10prozentige Salzsäure.

α) In der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper erzeugt verdünnte Salzsäure (10prozentig) eine Trübung, die beim Kochen nicht verschwindet.

β) In der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung entsteht bei Zusatz von 10prozentiger Salzsäure eine Trübung, die beim Kochen nicht verschwindet.

13. Fällung mit konzentrierter Salzsäure.

α) In der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Substanz fällt konzentrierte Salzsäure einen schmutzig-gelben Niederschlag aus. Lösung färbt sich hierbei nicht dunkel.

β) Aus der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung fällte konzentrierte Salzsäure einen schmutzig-gelben Niederschlag ohne Dunkelfärbung der überstehenden Lösung.

B. Eiweißfarbenreaktionen.

1. Setzt man zur 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper 1 Tropfen Millons Reagenz, so tritt ein grau-rosaer, massiger Niederschlag auf.

2. Essbach-Lösung fällt aus der 10prozentigen Essigsäureauflösung einen stark voluminösen gelben Niederschlag aus.

3. 10prozentige Essigsäureauflösung der Substanz versetzt mit Salpetersäure, zeigt zuerst einen hellgelben flockigen Niederschlag, der bei Zusatz von Kalilauge im Überschuß und Erhitzen einen dunklen orangefarbenen Ton annimmt. Auch die Lösung färbt sich beim Alkalisieren gelb (Xanthoprotein-Reaktion).

4. $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Substanz stärker alkalisiert und tropfenweise mit verdünnter Kupfersulfatlösung versetzt, gibt violette Färbung (Biuret-Reaktion).

5. Versetzt man die $^1/_{10}$ Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper mit Bleiazetat, so tritt keine Gelb-, Braun- oder Schwarzfärbung auf (Zystinprobe).

6. Reaktion von Adamkiewicz, Eisessig und konzentrierte Schwefelsäure zur Substanz gesetzt, fiel vollkommen negativ aus.

IV. Sonstige chemische Reaktionen.

Diese Untersuchungen wurden teils in 10prozentiger Essigsäureauflösung oder $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper, teils an der nicht entfetteten oder entfetteten Trockensubstanz ausgeführt.

A. Reaktionen an den Lösungen der Substanz in 10prozentiger Essigsäure und $^1/_{10}$-Normalnatronlauge.

1. Reaktion auf Kreatinin: 2 ccm der 10prozentigen Essigsäureauflösung geben bei Zusatz von Pikrinsäure und Kalilauge eine vorübergehende Braunfärbung, die sich sofort wieder aufhellt, während Kalilauge allein zugesetzt einen Niederschlag erzeugte (Reaktion von Jaffé).

2. Reaktion auf Kreatinin: $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper mit frisch bereiteter, stark verdünnter Nitroprussidnatriumlösung und dann mit einigen Tropfen Natronlauge versetzt, ergab keine Rubinrotfärbung der Flüssigkeit (Reaktion von Weyl).

3. Gibt man zur 10prozentigen Essigsäureauflösung der Substanz Orzin-Salzsäure tropfenweise und kocht, so tritt keinerlei Grünfärbung ein (Reaktion auf Pentosen nach Tollens).

4. Eine zweite Reaktion auf Pentosen in der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung der Heinzkörper mit α-Naphthol und Schwefelsäure in der Siedehitze fiel ebenfalls negativ aus.

5. Paraamidobenzaldehyd unter Zusatz von ein paar Tropfen Salzsäure gibt mit der 10prozentigen Essigsäureauflösung keine Reaktion auf Pyrrolkörper.

6. Probe der 10prozentigen Essigsäureauflösung mit Chlorzinkjod und Schwefelsäure ergibt keine Blaufärbung, aber einen gelbbraunen Niederschlag.

7. Uffelmanns Reagenz auf Milchsäure.

α) Karbolsäure und Eisenchlorid erzeugt in der 10prozentigen Essigsäureauflösung keine Reaktion.

β) In der $^1/_{10}$-Normalnatronlaugeauflösung erhielten wir eine Dunkelgelbfärbung bei Zusatz von Karbolsäure und Eisenchlorid.

8. Nesslers Reagenz gibt in der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper eine graue Trübung, die sich nach 24 Stunden zu einem grau-rosa Niederschlag verdichtet.

B. Reaktionen an der **nicht** entfetteten Trockensubstanz.

1. Murexidprobe: Die nicht entfettete Substanz der Heinzkörper wird auf einer Porzellanschale mit konzentrierter Salpetersäure erhitzt und die Säure vorsichtig abgedampft. Setzte man nun zu der durch die Salpetersäure hellgelb gefärbten Substanz einen Tropfen Natronlauge bzw. Ammoniak, so ging die Färbung nicht wie bei Anwesenheit von Harnsäure und Purinbasen in Rot oder Violett, sondern in Braun über.

2. Phosphorreaktion: Die nicht entfettete Substanz der Heinzkörper mit Soda und Salpeter geglüht, einige Male mit Salpetersäure abgeraucht, mit verdünnter Salpetersäure gelöst und mit Molybdänlösung versetzt, ergibt eine starke Phosphorreaktion.

C. Reaktionen an der entfetteten Trockensubstanz.

a) Prüfung auf Purin- und Nukleinbasen.

1. Prüfung auf Xanthin: Die entfettete Eiweißsubstanz wird mit Salpetersäure vorsichtig auf einer Porzellanschale erhitzt. Der Rückstand nahm nach Verdampfen der Säure eine gelbe Farbe an. Bei Zusatz von Natronlauge und Erhitzen trat eine Braun-, aber keine Violett- oder Rotfärbung auf.

2. Reaktion nach Capranica auf Guanin: Entfettete Eiweißsubstanz wird mit verdünnter Salzsäure gekocht, die enthaltene Kieselsäure, die wir bei der Extraktion der Fette und Lipoide zugesetzt hatten, abfiltriert und die heiße Lösung mit kalt gesättigter Lösung von Pikrinsäure versetzt. Es fiel sofort ein Niederschlag von seideglänzenden gelben Nadeln aus, der jedoch bei der mikroskopischen Betrachtung nicht als jene feinen, stark gelb gefärbten Nadeln sich aufwies, die man, wie wir es zur Kontrolle getan haben, erhält, wenn man Pikrinsäure auf eine Lösung von Guanin einwirken läßt, sondern sich als Fällung der mehr blaßgelben, viel größeren Pikrinsäurekristalle erwies. Auch mit chromsaurem Kali erhielten wir weder einen orangeroten kristallinischen Niederschlag, noch mit Ferrizyankalium eine gelbbraune Fällung in der salzsauren Lösung der entfetteten Eiweißsubstanz.

3. Kossels Reagenz auf Adenin: Entfettete Eiweißsubstanz wird eine halbe Stunde im Reagenzrohr mit Salzsäure und metallischem Zink versetzt, gekocht, dann filtriert und Filtrat mit Natronlauge stark alkalisiert und geschüttelt. Es zeigte sich keine rubinrote Färbung, die in Braunrot übergeht.

4. Reaktion nach Weidel auf Methyl-Xanthin: Entfettete Eiweißsubstanz wird mit einer frisch bereiteten Lösung von Chlorwasser gekocht und auf dem Wasserbad bis zum Trocknen verdampft. Den weißen Rückstand setzten wir 8 Stunden der Einwirkung einer Ammoniakatmosphäre unter einer dicht verschlossenen Glasglocke aus. Es zeigte sich weder Rot- noch Purpurviolettfärbung.

b) Prüfung auf **Phosphor** an der entfetteten Substanz.

Die durch Natriumbisulfat und konzentrierte Schwefelsäure von ihren organischen Bestandteilen befreite Substanz wurde, nachdem sie verschiedene Male mit Salpetersäure

gekocht und zum Trocknen verdampft war, mit verdünnter Salpetersäure gelöst und Molybdänlösung versetzt. Es sammelte sich innerhalb 24 Stunden ein in Anbetracht der angewendeten Substanzmenge verschwindend geringer, aber deutlicher Niederschlag.

V. Saponinversuche.

A. Reaktionen in Lösungen der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper.

Es wurden zu diesen Versuchen Saponinlösungen verschiedener Konzentration hergestellt. Wir verwandten solche mit NaCl versetzte Lösungen von 0,01 %, 0,1 % und 1 % Saponingehalt. Ferner 5prozentiges und 10prozentiges Saponin, aber nur in Aqua dest. gelöst. Dann versuchten wir Fällungen mit Sapotoxin, 1prozentig, 5prozentig, 10prozentig in Aqua dest. gelöst, Cyklamin 1prozentig in Aqua dest. gelöst und Digitonin 0,125prozentig in Aqua dest. gelöst.

1. 2 ccm der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper ergaben mit 2 ccm 0,01prozentigem und 0,1prozentigem, mit NaCl versetztem Saponin deutliche Trübung, die sich bis zum nächsten Tage als bräunlicher Niederschlag am Boden des Reagenzrohres absetzt.

2. Fällung mit 5prozentigem und 10prozentigem Saponin nur in Aqua dest. gelöst.

α) Nachdem wir uns vorher überzeugt hatten, daß 10prozentige Essigsäure mit diesen Saponinlösungen allein keine Reaktion gibt, versetzten wir je ccm 10prozentiger Essigsäureauflösung der Heinzkörper mit 2 ccm der 5prozentigen und 10prozentigen Saponinlösungen und erhielten mit beiden zarte Trübungen.

β) In der $^1/_{10}$ Normalnatronlaugenauflösung der Heinzkörper erzeugte 10prozentiges, in Aqua dest. gelöstes Saponin keine Fällung.

3. Mit Sapotoxin, das wir in Lösungen mit Aqua dest. von 1 %, 5 %, 10 % herstellten, erhielten wir bei Anwendung von 2 ccm der Reagentien mit 2 ccm der 10prozentigen Essigsäureauflösung bei 5prozentigem und 10prozentigem Sapotoxin deutliche Niederschläge, während die 1prozentige Sapotoxinlösung keine Fällung mehr hervorrief.

4. Bei Cyklamin, das wir wegen seiner Schwerlöslichkeit nur in Konzentration von 1 % in Aqua dest. anwenden konnten, erzielten wir wie bei Sapotoxin in dieser Verdünnung mit der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper keinen Niederschlag.

5. Ebenso stellten wir noch Versuche mit Digitonin an, von dem wir wegen seiner Schwerlöslichkeit nur eine Konzentration von 0,125 % erzielen konnten, die mit der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper keinen Niederschlag erzeugte.

6. Der aus der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper mit 10prozentigem, in Aqua dest. gelösten Saponin gefällte Niederschlag läßt mit Chloroform und konzentrierter Schwefelsäure versetzt, eine dunkelbraun-rote Farbe in Chloroform ausschütteln. Saponinlösung in destilliertem Wasser allein mit Chloroform und konzentrierter Schwefelsäure versetzt, ergibt ebenfalls eine dunkelviolettrote Farbe, die sich aber nicht in Chloroform löst, sondern in der Schwefelsäure verbleibt.

B. Mikroskopische Untersuchung.

Der aus der 10prozentigen Essigsäureauflösung der Heinzkörper mit 10prozentigem, in Aqua dest. gelöstem Saponin gefällte Niederschlag zeigt bei der mikroskopischen Untersuchung nichts Bemerkenswertes.

VI. Prüfung auf Fettkörper und Lipoide.

Zur Vorbereitung der Heinzkörpersubstanz für die Untersuchung auf Fettkörper und Lipoide war es erforderlich, um ein einwandfreies Material zu gewinnen, vor allem darauf zu achten, daß bei der Isolation der Vergiftungssubstanz aus dem Blut und beim Reinigen keine Reagentien in Anwendung kamen, die irgendwie lösend oder zersetzend auf Fettkörper und Lipoide einwirken und infolgedessen einen Verlust verursachen konnten. Abweichend von Hartwigs Methode verfuhren wir daher in folgender Weise:

Die Gerinnung des Blutes beim Auffangen wurde durch verdünnte Kaliumoxalatlösung verhindert. Wir richteten es so ein, daß das Gemenge gerade 0,1% Oxalat enthielt, indem zuerst mit einer bestimmten Anzahl von Kubikzentimetern der Kaliumoxalatlösung die Wände des zum Auffangen des Blutes bestimmten sterilen Gefäßes sorgfältig bespült wurden. Sodann gaben wir nicht gleich die ganze Menge, sondern während des Auffangens unter Durchschütteln immer kleinere Mengen der Kaliumoxalatlösung zu und erzielten so ein gleichmäßiges Gemisch mit dem Blut, das gerade bei den Pyrodinvergiftungen eine große Neigung zur Gerinnung zeigt und oft schon während des Auffangens in den oberen Schichten, die nicht sofort mit der gerinnungshemmenden Substanz in Berührung kamen, große Gerinnungspfröpfe erzeugte. Auf diese Weise erhielten wir ein vollkommen dünnflüssiges Material, das zentrifugiert, von Serum befreit und viermal mit physiologischer Kochsalzlösung sorgfältig gewaschen und zentrifugiert wurde. Zum Lackfarbenmachen der Blutkörperchen konnte Äther, als Extraktivmittel für Fette und Lipoide, nicht in Anwendung kommen. Wir benutzten deshalb nur destilliertes Wasser. Da die Resistenz der Blutkörperchen bei Pyrodinvergiftung erhöht ist, so bestanden bei Benutzung von destilliertem Wasser ohne

weiteren Zusatz Schwierigkeiten beim Lackfarbenmachen. Wir verfuhren daher in folgender Weise:

Die mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Blutkörperchen wurden in den Zentrifugierrohren mit der entsprechenden Menge destillierten Wassers versetzt und dann in einem Erlmeyer-Kolben zwanzig Minuten kräftig durchgeschüttelt. Es konnte dabei starke Schaumentwicklung beobachtet werden. Sodann füllten wir die Zentrifugierrohre und zentrifugierten eine halbe Stunde. Die stark dunkelrot gefärbte klare Flüssigkeit wird abgegossen, mit destilliertem Wasser nachgefüllt und wieder zwanzig Minuten im Erlmeyer-Kolben geschüttelt. Nachdem das Verfahren viermal wiederholt und noch zwei- bis dreimal die Substanz außerdem mit destilliertem Wasser ausgewaschen worden war, erhielten wir ein absolut reines Material, das mit Nilblauvitalfärbung bei der mikroskopischen Betrachtung ausschließlich Heinzkörperchen und wenige Leukozyten zeigte und dessen Waschflüssigkeit keine Blutfarbstoffreaktion mit Benzidin + H_2O_2 mehr ergab. Die so erhaltene Substanz wurde nun vorsichtig fast zur Trockne auf dem Wasserbad eingedampft, dann im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure völlig lufttrocken gemacht und, mit reiner Kieselsäure gemischt, im Achatmörser fein zerrieben. Bei unseren Untersuchungen auf Fette und Lipoide hielten wir uns ganz an die Methode von Erlandsen. Sie besteht darin, daß man die lufttrockene Substanz zuerst mit Äther, dann mit Alkohol erschöpft. Im Ätherextrakte befinden sich Neutralfette, Fettsäuren, Cholesterin und die Monophosphatide. Aus dem Alkoholextrakt erhält man die Diamidophosphatide, welche in den Geweben nicht frei, sondern gebunden vorkommen sollen. Sodann wird die Substanz noch mit anderen Extraktionsmitteln fraktioniert der Reihe nach weiter behandelt.

1. Ätherextrakt.

Die lufttrockene, mit Kieselsäure zerriebene Substanz wurde achtzehn Stunden der Ätherextraktion im Soxhletapparat unterworfen. Nach Verdunsten des Äthers erhielten wir einen in Anbetracht der angewandten Substanzmenge äußerst minimalen Rückstand von aromatischem Geruch, der bei der Wärme des Wasserbades schon flüssig ist und einen Schmelzpunkt von ungefähr 50°, wie das auch schon Dr. Pinkussohn[1]) früher festgestellt hatte, ergab. Wir entnahmen der Ätherauflösung eine Probe zur Mikroskopie und fanden außer einem in büschelförmig angeordneten Nadeln kristallisierten Körper typische Cholesterinkristalle, die

[1]) Sazuki, Fol. Haemat. 1912, Bd. XIII, Archiv, Aprilheft, S. 213.

sich mit einer Mischung von fünf Teilen Schwefelsäure und einem Teil Wasser von den Rändern aus rot und dann violett färbten. Die Substanz des Ätherextraktes war so gering, daß wir nur wenige Reaktionen damit anstellen konnten. Sie löste sich vollkommen in Azeton. Mit Chloroform und konzentrierter Schwefelsäure versetzt, färbte sich das Chloroform intensiv violettrot, also eine stark positive Salkowskische Reaktion. Auch mit Rohrzucker und konzentrierter Schwefelsäure erhielten wir die Pettenkofersche Reaktion positiv.

2. Alkoholextrakt.

Nach neun Stunden Extraktion mit heißem Äthylalkohol im Soxhletapparat erhielten wir einen bedeutenden Rückstand, der in der alkoholischen Auflösung braun gefärbt war. Die Menge der Substanz betrug ungefähr das Zehnfache des Ätherextraktes und war dunkelbraun gefärbt. In Azeton löste er sich nur sehr schwer, selbst beim Erwärmen nur zu geringen Teilen mit roter Farbe und konnte aus der alkoholischen Lösung mit Azeton nicht ausgefällt werden. Es war nur der Umschlag der Färbung von Braun in Rot dabei zu beobachten. Bei 116°—118° fing er gerade an zu schmelzen und besaß einen eigentümlichen tranigen Geruch. Mit Alkohol, Äther oder Azeton verdunstet, zeigte er bei der mikroskopischen Betrachtung keinerlei Kristallbildung. Die Salkowskische Reaktion mit Schwefelsäure und Chloroform fiel negativ aus, während sich die Pettenkofersche Probe mit Rohrzucker und konzentrierter Schwefelsäure als positiv erwies. In Pyridin löste sich dieser Körper mit brauner Farbe. Zerstört man diese Substanz mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Natriumbisulfat, raucht dann mit Salpetersäure ab, löst den Rückstand in verdünnter Salpetersäure, so erhält man beim Versetzen der Lösung mit Molybdänlösung und bei vorsichtigem Erhitzen, nicht bis zum Kochen, eine starke Phosphorreaktion.

3. Benzolextrakt.

Nach neunstündiger Extraktion mit heißem Benzol erhielten wir eine grünlichgelb gefärbte Lösung, die beim Eindampfen einen dunkelbraungrünen Rückstand ergab, der in Pyridin löslich ist und bei der mikroskopischen Betrachtung keine Kristallbildung zeigte. Sein Schmelzpunkt liegt bei 116°. Er löste sich schwer mit gelbroter Farbe in Azeton. Die Gesamtmenge betrug ein Viertel des Alkoholextraktes. Mit konzentrierter Schwefelsäure und Natriumbisulfat geschmolzen, zeigte sein anorganischer Bestandteil in salpetersaurer Lösung mit Ammoniummolybdat versetzt und erhitzt, starke Phosphorreaktion.

4. Methylalkoholextrakt.

Nachdem neun Stunden mit heißem Methylalkohol im Soxhletapparat extrahiert worden war, erhielten wir einen Rückstand von dunkelbraungrüner Färbung, der ebenso, wie der Alkohol- und Benzolextrakt in bezug auf Schmelzpunkt, Löslichkeit und Färbung in Azeton, positive Phosphorreaktion und bei der mikroskopischen Betrachtung gleiche Eigenschaften zeigte, wie der Alkohol- und Benzolextrakt.

5. Benzinextrakt.

Es wurde ebenfalls neun Stunden extrahiert. Die Menge der hierbei gewonnenen Substanz war so gering, daß wir keinen Phosphor mehr bestimmen konnten. Er besaß denselben Schmelzpunkt wie die übrigen Extrakte.

Ein ebenfalls aus frischer, nur durch Äther vorbehandelter Substanz gewonnener Benzinextrakt zeigte auch in bezug auf Phosphorreaktion dieselbe Eigenschaft wie die anderen Extrakte.

6. Essigätherextrakt.

Neun Stunden Extraktion. Menge der Substanz so gering, wie Benzinextrakt. Schmelzpunkt wie bei den übrigen Extrakten.

7. Chloroformextrakt.

Neun Stunden Extraktion. Kein Rückstand mehr nachzuweisen.

Nachdem in Obigem der Verlauf der von uns angestellten Reaktionen an der Substanz der Heinzkörper in ihren Details genau beschrieben worden ist, fügen wir der besseren Übersicht halber noch einige Tabellen bei.

Tabelle I.

Reagenz	10proz. Essigsäureauflösung	$^1/_{10}$ n-Natronlaugeauflösung
	a) Spektroskopie.	
	Verdunklung nach Blauviolett	schwacher, kaum merklicher Schatten im Gelb-Orange
	b) Blutfarbstoffreaktionen.	
Wasserstoffsuperoxyd allein zugesetzt	keine Katalasewirkung	—
Benzidin allein zugesetzt	keine Blaufärbung	—
α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin	keine Indophenolreaktion	—
Hydroxylamin	leichte Trübung, keine Verfärbung	—
Ferrizyankalium	grünlich gelber Niederschlag	—
Benzidin und Wasserstoffsuperoxyd	deutliche, grünliche Verfärbung	hellbraune Färbung

Reagenz	10proz. Essigsäureauflösung	$^1/_{10}$n-Natronlaugeauflösung
	c) Eisenreaktionen.	
Ferrozyankalium und Salzsäure	(keine Blaufärbung) graubraune Ausfällung	—
Rhodanammonium	keine Rotfärbung	keine Rotfärbung
Schwefelammonium	—	keine schwarze Fällung
	d) Eiweißfällungsreaktionen.	
Phosphormolybdänsäure	graubrauner Niederschlag	—
Alkohol absolutus	keine Fällung	keine Fällung
Methylalkohol	keine Fällung	keine Fällung
Azeton	kein Niederschlag	—
Formol	Lösung bleibt klar	—
10proz. Pyrogallol	keine Reaktion	—
Kochen der Lösung	kein koaguliertes Eiweiß	kein koaguliertes Eiweiß
konzentriertes Ammoniumsulfat zum Aussalzen	gelbweißer, voluminöser Niederschlag	stark voluminöser brauner Niederschlag
2proz. Osmiumsäure	keine Reaktion	Gelbfärbung
Ammoniak und Überschuß von Ammoniak	keine Lösung des gefällten Niederschlages bei Überschuß von NH_4OH	—
Salpetersäure	fällt einen Niederschlag, der sich beim Erwärmen auflöst und in der Kälte wieder ausfällt. Albumose	—
$^1/_{10}$n-Natronlauge	keine Fällung	—
10proz. Essigsäure	—	keine Fällung
konzentrierte Essigsäure	—	fällt stark voluminösen Niederschlag, der sich im Überschuß des Reagenz wieder löst
10proz. Kalilauge	fällt bei vorsichtigem, tropfenweisem Zusatz gegen den Neutralisationspunkt einen grauweißen Niederschlag aus	—
verdünnte Salzsäure	Trübung auch beim Kochen	Trübung auch beim Kochen
konzentrierte Salzsäure	schmutzig gelber Niederschlag, keine Dunkelfärbung der Lösung	schmutzig gelber Niederschlag, keine Dunkelfärbung der Lösung
verdünnte Kochsalzlösung (0,2—1proz.)	keine Trübung, auch nicht beim Erhitzen	keine Trübung, auch nicht beim Erhitzen

Reagenz	10proz. Essigsäure-auflösung	$^1/_{10}$n-Natronlaugeauflösung
	e) Eiweißfarbenreaktionen.	
Millons-Reagenz	graurosaer, massiger Niederschlag	—
Essbach-Lösung	stark voluminöser gelber Niederschlag	—
Biuret-Reaktion, Kupfersulfat und KOH	—	violette Färbung
Zystinprobe mit Bleiazetat	—	negativ
Reaktion von Adamkiewicz mit konzentrierter H_2SO_4	negativ	—
	f) Saponinversuche.	
1proz. Saponin	bräunlicher Niederschlag	—
10proz. Saponin	bräunlicher Niederschlag	keine Trübung
5- und 10proz. Sapotoxin	Niederschlag	—
1proz. Zyklamin	kein Niederschlag	—
0,120- und 0,125proz. Digitonin	kein Niederschlag	—
	g) Verschiedene Reaktionen.	
Reaktion auf Kreatinin (Pikrinsäure und Kalilauge)	vorübergehende Braunfärbung	—
Reaktion auf Kreatinin (Nitroprussidnatrium und Natronlauge)	—	keine Rubinrotfärbung
Reaktion auf Pentosen (Orzinsalzsäure nach Tollens)	keine Grünfärbung	—
Reaktion auf Pentosen (α-Naphthol und H_2SO_4)	negativ	—
Reaktion auf Pyrrolkörper (Paraamidobenzaldehyd und Salzsäure)	keine Reaktion	—
Reaktion auf Zellulose (Chlorzinkjod und H_2SO_4)	keine Blaufärbung	—
Uffelmanns Reagenz auf Milchsäure (Karbolsäure u. Eisenchlorid)	keine Reaktion	Dunkelgelbfärbung
Nesslers Reagenz auf Ammoniumbasen	graue Trübung	—

Tabelle II.

Reagenz	Reaktionen an der nicht entfetteten Trockensubstanz
Salpetersäure und Kalilauge	a) Eiweißreaktion. Heinzkörpersubstanz mit Salpetersäure versetzt und erhitzt, färbt sich gelb; die gelbe Farbe geht bei Zusatz von Kalilauge in Braun über (Xanthoproteinreaktion).
Ammoniummolybdat und HNO_3	b) Phosphorreaktion. Substanz der Heinzkörper mit Soda und Salpeter geschmolzen und geglüht, dann in HNO_3 gelöst, gibt mit Ammoniummolybdat starke Phosphorreaktion.
Ferrozyankalium und Salzsäure	c) Eisenreaktion. Substanz der Heinzkörper mit Soda und Salpeter geschmolzen und geglüht, dann in HNO_3 gelöst, gibt bei Zusatz von Ferrozyankalium und Salzsäure Berlinerblau-Reaktion.

Tabelle III.

Reagenz	Reaktionen an der entfetteten Trockensubstanz
Ferrozyankalium und Salzsäure	a) Reaktion auf Eisen. Entfettete und mit Natriumbisulfat und konzentrierte H_2SO_4 behandelte Substanz gibt positive Berlinerblau-Reaktion.
Benzidin und H_2O_2	b) Blutfarbstoffreaktion. Entfettete Substanz gibt mit Benzidin und H_2O_2 in essigsaurer Lösung eine deutliche blaue Peroxydasereaktion.
Ammoniummolybdat und HNO_3	c) Phosphorreaktion. Entfettete Substanz, mit Natriumsulfat und konzentrierter H_2SO_4 behandelt, gibt in Anbetracht der angewandten Menge nur eine minimale, aber deutliche Phosphorreaktion.
Salpetersäure und Natronlauge bzw. NH_3 Murexidprobe	d) Reaktion auf Purinbasen. Entfettete Substanz der Heinzkörper mit HNO_3 auf Porzellanschale verdampft, ergibt eine Gelbfärbung, die bei Zusatz von Natronlauge und Erhitzen nicht in Rot oder Violett übergeht.

Reagenz	Reaktionen an der entfetteten Trockensubstanz
Pikrinsäure	Entfettete Substanz mit verdünnter Salzsäure gekocht, filtriert und Filtrat mit kalt gesättigter Pikrinsäure versetzt, ergibt Niederschlag von seideglänzenden Nadeln, die sich nicht als charakteristische Guanin-Pikrinsäurekristalle bei der mikroskopischen Betrachtung erwiesen, (Reaktion nach Capranica) auf Guanin.
Kossels Reaktion auf Adenin	Entfettete Substanz mit Salzsäure und Zink gekocht, filtriert und Filtrat mit Natronlauge stark alkalisiert, gibt keine Rubinrotfärbung.
Weidels Reaktion auf Methyl-Xanthin	Entfettete Substanz mit Chlorwasser gekocht, auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft, zeigt nach 8stündiger Einwirkung einer Ammoniakatmosphäre keine Rot- oder Purpurviolettfärbung.

Tabelle IV.

Reagenz	Reaktionen an den Fetten und Lipoiden
Ammoniummolybdat und HNO_3	Alkohol-, Benzol-, Methylalkohol-, Benzin-Extrakt der Heinzkörper geben nach Behandlung mit Natriumbisulfat und konzentrierter H_2SO_4 mit Ammoniummolybdat und HNO_3 starke Phosphorreaktionen.
Chloroform und konzentrierte Schwefelsäure	Ätherextrakt in Chloroform gelöst, gibt bei Zusatz von konzentrierter H_2SO_4 starke Purpur-Violettfärbung des Chloroforms (Salkowskische Reaktion auf Cholesterin).
Rohrzucker und konzentrierte H_2SO_4, Reaktion auf Ölsäure	Äther-, Alkohol-, Benzol-, Methylalkohol-, Benzin-Extrakt geben mit Rohrzuckerlösung und konzentrierter Schwefelsäure eine Rotfärbung (Pettenkofersche Reaktion).

Tabelle V.

Art der Substanz	Mikroskopische Untersuchungen
Heinzkörper - Aufschwemmung in Aqua destill.	Versetzt man unter dem Objektträger eine Aufschwemmung von Heinzkörperchen mit Benzidin und Wasserstoffsuperoxyd, so färben sich die Heinzkörper deutlich blau, während die Flüssigkeit ungefärbt bleibt (Peroxydasereaktion).

Art der Substanz	Mikroskopische Untersuchungen
Heinzkörper gelöst in Essigsäure	Setzt man zu einer stark konzentrierten, dunkelbraungrünen Auflösung der Heinzkörper in konzentrierter Essigsäure auf dem Objektträger Kochsalz, so findet man bei der mikroskopischen Untersuchung gelbliche, wachsartige Schollen und braunrote Klumpen und Splitter, aber keine Häminkristalle (Teichmannsche Probe).
Saponinniederschlag aus der essigsauren Lösung der Heinzkörper	Mikroskopiert man den aus der essigsauren Lösung der Heinzkörper mit zehnprozentiger Saponinlösung gefüllten Niederschlag, so findet man nichts, was an die Form der Heinzkörper erinnert.
Ätherextrakt der Heinzkörper	Ätherextrakt der Heinzkörper zeigt bei der mikroskopischen Untersuchung typische Cholesterinkristalle, die sich bei Zusatz einer Mischung von 5 Teilen konzentrierter H_2SO_4 und 1 Teil H_2O von den Rändern aus rot und dann violett färben (Salkowskische Reaktion).
Alkohol-, Benzol-, Methylalkohol-, Benzinextrakt der Heinzkörper	Alle übrigen Extrakte, außer dem Ätherextrakt der Heinzkörper zeigen bei der mikroskopischen Betrachtung keinerlei Kristallbildung, sondern stets eine amorphe Beschaffenheit.

Ergebnisse.

Aus unseren Untersuchungen geht nunmehr hervor, daß die Heinzkörper als wesentlichen Bestandteil einen Eiweißkörper enthalten, den man als ein zum Syntonin denaturiertes Histon ansprechen kann. Er gibt nicht die Schwefelbleireaktion mit Alkali und Bleiazetat, aber eine positive Biuretreaktion. Millons Reagenz (grau-rosaer Niederschlag) kann man bei ihm vielleicht noch als ganz schwach positiv bezeichnen. Ferner zeigte er folgende von Kossel zuerst am Gänseblut histon studierten zwei Reaktionen:

1. Er gibt mit Ammoniak einen im Überschuß des Fällungsmittels unlöslichen Niederschag.
2. Salpetersäure erzeugt einen Niederschlag, der beim Erwärmen verschwindet und beim Erkalten zum Vorschein kommt.

Für seine Denaturierung zum Syntonin spricht die Unlöslichkeit in Wasser und verdünnter Kochsalzlösung. Ferner seine Leichtlöslichkeit

mit Opaleszenz in stark verdünnten Säuren und Alkalien in der Kälte. Ich weise an dieser Stelle auf die Arbeit von R. Mörner[1]) hin, der ein Syntonin aus dem Eiweiß des Hühnereiweißes darstellte und fand, daß, wie auch aus unseren Versuchen an der Heinzkörpersubstanz hervorgeht, sich dieses in der Kälte mit opaleszenter Trübung in stark verdünntem Natriumkarbonat löst, beim Erhitzen auf dem Wasserbad leicht eine klare Lösung gibt und sich hierbei in Alkalialbumin verwandelt. Er trägt nicht den Charakter einer Säure, wie man bei Alkalialbumin beobachten kann, das sich unter Entwicklung von Kohlensäure mit einer Aufschwemmung von $CaCO_3$ löst. Seine Lösung in Säure und Alkali koaguliert weder beim Kochen, noch wird es durch Zusatz von Alkohol aus diesen Lösungen gefällt. Durch vorsichtige Neutralisation mit Alkali fällt er aus der schwachsauren Lösung aus. Wie Mörner bei Untersuchung seines Syntonins, beobachteten auch wir, daß bei Zusatz von Essigsäure in der alkalischen Lösung ein Niederschlag ententsteht, der im Überschuß der Säure löslich ist. Durch verdünnte Kochsalzlösung (0,2- bis einprozentig) wird seine Lösung beim Erwärmen nicht getrübt. (Globulin, Paraglobulin werden gefällt). Dagegen wird er mit gesättigten Lösungen von Ammonsulfat leicht ausgefällt.

Der negative Ausfall der Reaktionen auf Purin- und Nukleinbasen weist darauf hin, daß Nukleinsäuren und Nukleine nicht anwesend sind. Die minimale Phosphorreaktion der entfetteten Eiweißsubstanz erklärt sich dadurch, daß die Phosphatidlipoide sich schon beim Erhitzen leicht unter Abspaltung von Phosphorsäure zersetzen können, die sich bei der Extraktion von der Eiweißsubstanz nicht trennen läßt.

2. Nach dem Eiweißkörper kann man als weiteren beträchtlichen Bestandteil der Heinzkörper ein Lipoid ansprechen, das zur größten Menge durch Alkohol extrahiert wurde. Da es starke Phosphorreaktionen zeigte und sich im Ätherextrakt nicht vorfand, kann man nach Erlandsen annehmen, daß es sich um Diamidophosphatid handelt. Im Ätherextrakt, der an und für sich ganz minimal war, wurde durch die verschiedenen charakteristischen Reaktionen Cholesterin nachgewiesen. Auch die Trübungen mit Saponin sind wohl mit der Anwesenheit von Cholesterin in Beziehung zu bringen, denn wie Hausmann gezeigt hat, wird durch Besetzung der Hydroxylgruppe die Saponinhämolyse gehemmt, indem Verbindungen zwischen Saponin und Cholesterin entstehen.

3. Die von uns sowohl an der ursprünglichen Substanz, wie auch an dem entfetteten Eiweißkörper angestellten Blutfarbstoff- und Eisen-

[1]) Pflügers Archiv, Bd. XVII.

reaktionen zeigen, daß die Heinzkörper ein eisenhaltiges Blutfarbstoffderivat in äußerst geringen Mengen enthalten müssen, das spektroskopisch nicht mehr nachweisbar ist und deshalb nicht näher charakterisiert werden kann.

Fassen wir nun das Ergebnis unserer Untersuchungen zusammen, so folgt daraus, daß wir insofern über das Resultat Hartwigs hinausgekommen sind, als es uns gelungen ist, den Eiweißkörper, von dem Hartwig schließt, daß er eine Verwandtschaft zu Paranuklein bzw. Histon besitzt, durch die von uns angestellten Reaktionen als ein zum Syntonin denaturiertes Histon in eingehender Weise charakterisiert haben.

Was den Gehalt der Heinzkörper an Fettkörpern und Lipoiden anbetrifft, so haben wir im Gegensatz zu Hartwig Cholesterin, wenn auch in geringen Mengen, durch die Salkowskische Reaktion mit Chloroform und konzentrierte H_2SO_4 und durch die mikroskopische Untersuchung nachgewiesen.

Wir stellten ferner fest, daß die Heinzkörpersubstanz ein Diamidophosphatid enthält. Es bestätigt sich hierdurch Hartwigs Vermutung von dem Vorhandensein einer Eiweiß-Lipoidlegierung, da die Diamidophosphatide nach Erlandsen an den Eiweißkörpern gebunden vorkommen sollen.

Ferner bestätigen wir, daß das von Hartwig nachgewiesene eisenhaltige Blutfarbstoffderivat vorhanden ist, besonders dadurch, daß wir eine positive Peroxydasereaktion erhielten und durch die Berliner Blaureaktion den Eisennachweis führen konnten. Über die Natur dieses Körpers konnten wir, wie oben schon erwähnt, wegen seiner geringen Menge nichts Näheres ermitteln.

Wir kommen also zu dem **Schluß,** daß die Heinzkörper

1. ein zum Syntonin denaturiertes Histon,
2. ein an den Eiweißkörper gebundenes Diamidophosphatid,
3. in geringer Menge Cholesterin,
4. ein eisenhaltiges Blutfarbstoffderivat

enthalten.

Es ist somit hier ein zirkumskripter, morphologisch wohlumschriebener Bestandteil des Erythrozytenplasma isoliert und chemisch näher definiert worden, und es ist bewiesen worden, daß die durch met-hb-bildende Gifte partiell vergifteten Erythrozyten an jenen am fixierten Bluttrockenpräparat hyperoxyphil erscheinenden Stellen in der Tat ein

eisenhaltiges Derivat des Blutfarbstoffes erhalten, welches trotz seiner Hyperoxyphilie (mikroskopische Hyperchromie) kein eigentliches Hämoglobin, also funktionell minderwertig ist, wennschon es nicht Met-hb ist.

Zum Schluß erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. A. Pappenheim für das mir gestellte Thema und die mir bereitwilligst geleistete Hilfe bei der Ausführung dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Hugo Kunkel, geboren am 23. Juli 1885 zu Darmstadt, Kreis Darmstadt, Sohn des Rentiers Otto Kunkel, besuchte zu Darmstadt das Realgymnasium und erwarb daselbst das Reifezeugnis. Oktober 1906 wurde ich bei der philosophischen Fakultät der Universität Berlin immatrikuliert und studierte Chemie. Nach 4 Semestern naturwissenschaftlichen Studiums legte ich das chemische Verbandsexamen in anorganischer, organischer und analytischer Chemie ab und liess mich im Oktober 1908 bei der medizinischen Fakultät der Universität Berlin inscribieren. April 1909 diente ich ein halbes Jahr beim I. Seebataillon und war gleichzeitig bei der Universität Kiel von April 1909 bis Oktober 1909 immatrikuliert. Oktober 1909 setzte ich mein medizinisches Studium in Berlin fort und bestand im April 1911 daselbst die ärztliche Vorprüfung. Von April 1911 bis Oktober 1911 studierte ich in München und besuchte dann von Oktober 1911 bis April 1913 die Kliniken in Berlin. Seit April 1913 bin ich in Heidelberg immatrikuliert und legte in Heidelberg das medizinische Staatsexamen ab am 5. Dezember 1913.